缺刻缘绿藻 CDP-乙醇胺: 1, 2-二酰甘油乙醇胺磷酸转移酶的基因 特征与功能鉴定

焦建璐¹, 封兵¹, 毕燕会¹, 周志刚²

1. 上海海洋大学,水产种质资源开发利用教育部重点实验室,上海 201306;

2. 上海海洋大学,国家海洋生物科学国际联合研究中心,上海 201306

摘要:运用反转录 PCR 与 5'-及 3'-末端快速扩增技术,从缺刻缘绿藻(*Myrmecia incisa* Reisigl) H4301 中克隆到胞苷 二磷酸(CDP)-乙醇胺:二酰基甘油乙醇胺磷酸转移酶(EPT)的基因 *MiEPT*。其 cDNA 序列全长 1914 bp,其中,5'-非 翻译区(UTR)长 217 bp,3'-UTR 长 533 bp,开放阅读框(ORF)长 1164 bp,编码由 387 个氨基酸组成的蛋白。以缺刻 缘绿藻基因组 DNA 为模板扩增到该基因的 DNA 序列,长为 2853 bp。这两条序列的比对结果显示,*MiEPT* 含有 6 个 内含子,它们将其 ORF 分隔成 7 个外显子。经预测,MiEPT 为含有 8 个跨膜区的膜整合蛋白。多序列比结果显示, MiEPT 具有 CDP-醇磷脂酰转移酶基序。基于不同物种 EPT 的氨基酸序列所构建的邻接聚类结果表明,MiEPT 与已 知功能的莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)EPT 聚类在一起,由此推测,MiEPT 可以催化磷脂酰乙醇胺(PE)的生 物合成。为鉴定 *MiEPT* 的基因功能,利用表达载体 pET-23a 实现了在大肠杆菌中重组表达 MiEPT 的目的。使用超 离心技术,获得部分纯化含重组 MiEPT 的组分。体外酶促反应的产物经薄层层析分析显示,重组表达的 MiEPT 具 有 EPT 和胆碱磷酸转移酶(CPT)的活性。经棒状薄层色谱的定量分析,可知 MiEPT 的 EPT 酶活性是 CPT 的 10.3 倍,从 而表明, MiEPT 在缺刻缘绿藻中能同时参与 PE 和磷脂酰胆碱的生物合成,但更倾向利用 CDP-乙醇胺生产 PE。

关键词:缺刻缘绿藻;乙醇胺磷酸转移酶(EPT);胆碱磷酸转移酶(CPT);磷脂酰乙醇胺(PE);磷脂酰胆碱(PC);膜 蛋白

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章

文章编号:1005-8737-(2021)02-0123-13

甘油脂(glycerolipids)是指甘油碳骨架上酯化 2 个或 3 个脂肪酸的脂类^[1]。前者中的第 3 个碳位 若结合磷酸基团,即形成磷脂,例如磷脂酰乙醇 胺(phosphatidylethanolamine, PE)和磷脂酰胆碱 (phosphatidy-lcholine, PC),是植物、藻类等细胞 中膜脂的主要组成部分^[1-2];而后者即为三酰甘 油(triacylglycerol, TAG),系藻类细胞中的主要储 存脂^[3]。结构的相似性意味着两者具有相似的合 成代谢过程。在从头合成 PE、PC 及 TAG 的 Kennedy 途径(图 1)中,二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)是 PE、PC 等膜脂及 TAG 等储存脂的分水 岭^[4-5]: 在胞苷二磷酸(cytidine diphosphate, CDP)-乙醇胺: 1, 2-二酰基甘油乙醇胺磷酸转移酶 (CDP-ethanolamine: 1, 2-diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase; EC 2.7.8.1, 通常也简称为 乙醇胺磷酸转移酶, EPT)的作用下,将来自 CDP-乙醇胺上的磷酸乙醇胺(phosphoethanolamine)转 移至 DAG 甘油碳骨架的 sn-3 位置上,从而产生 PE,并释放副产品 CMP^[6-7]。此结果将导致 PE(或 PC)等膜磷脂的含量增加,而 TAG 的含量则降低。 因此, EPT 在维持藻类细胞中膜脂与储存脂之间 的动态平衡中发挥着重要作用。

收稿日期: 2020-08-13; 修订日期: 2020-09-16.

基金项目:国家自然科学基金项目(31772821);国家"双一流"水产学科项目.

作者简介: 焦建璐(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为藻类生物技术.

通信作者:周志刚,博士,教授. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

藻类 TAG 在动物饵料、人类食品添加剂甚至 生物质燃料等方面的广泛应用^[3,5],越来越激发人 们对其探讨的兴趣。鉴于 EPT 在 TAG 累积或 PE (或 PC)合成过程中的重要作用,以及除莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)^[8]以外几乎没有关于 藻类 EPT 的报道,本研究以缺刻缘绿藻(*Myrmecia incisa* Reisigl) H4301 这种富含花生四烯酸的非模 式微藻^[9]为材料,在其转录组的文库数据^[10]中搜 索到 1 条 contig17194_8,它与莱茵衣藻的 EPT 序 列(GenBank 登录号: XP_001692856.1)有 51.48% 一致性, 据此设计引物, 利用 cDNA 末端快速扩 增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE) 得到其 cDNA 全长序列; 在特征分析的基础上, 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中异源表达、分离并 纯化这种重组的膜蛋白; 经重组目的蛋白的酶活 性检测以鉴定该基因的功能。本研究可为借助基 因工程实现在缺刻缘绿藻等藻细胞中积累 TAG 的研究提供理论基础。



图 1 真核藻类从头合成三酰甘油及磷脂酰乙醇胺的 Kennedy 途径 Fig. 1 The Kennedy pathway for *de novo* synthesis of triacylglycerol and phosphatidylethanolamine in eukaryotic algae

1 材料与方法

1.1 藻种与培养

缺刻缘绿藻 H4301 系单细胞绿藻^[11],来源于 布拉格查理斯大学藻类收藏中心(Culture Collection Of Algae of Charles University of Prague),由暨南 大学张成武教授馈赠。将藻接种于 BG-11 液体培 养基^[12]中,在 25 ℃和 115 µmol(quanta)/(m²·s)的 光照培养箱中培养,光周期为光照:黑暗=14 h: 10 h^[9],每天不定期地摇晃。待长至指数生长期 (约 2 周),4 ℃下以 5500 r/min 的转速离心 10 min, 收集藻细胞,并用灭菌去离子水洗涤 3 次后再次 同样离心收集藻细胞,立即提取 RNA 和 DNA 或 用液氮速冻,-80 ℃保存备用。

1.2 contig 序列的 PCR 扩增

使用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)并参照其说明从缺刻缘绿藻细胞中提取总 RNA;利用 PrimeScriptTM RT 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)并按照其说明从总 RNA 中合成 cDNA。根据自缺刻缘

绿藻转录组数据库^[10]中筛选到的 contig17194_8 序列,利用网站 PCR Primer Stats (http://www. Bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) 在 线设计 1 对引物 17194F 和 17194R (表 1),并以合 成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增来验证该 contig 序列。25 µL 的 PCR 反应体系包含 12.5 µL 的 2×Taq PCR Master Mix [天根生化科技(北京)有 限公司,下同], 1 µL 模板 cDNA,上、下游引物各 1 µL 及无 RNA 酶的去离子 H₂O。PCR 反应程序: 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 45 s, 65 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 30 s, 35 个循环; 72 ℃延伸 10 min, 4 ℃保存。

扩增反应后,取 20 μL 产物用 1.0%的琼脂糖 凝胶进行电泳检测;采用天根生化科技(北京)有 限公司生产的琼脂糖凝胶回收试剂盒进行 PCR 产 物的纯化;按照北京全式金生物技术有限公司的 说明,将 PCR 产物连接至克隆载体 pEASYR;将 构建好含目的片段的克隆载体利用热激法转化到 大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞(北京全式金生物 技术有限公司)中;将转化的细胞均匀涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素钠(Amp)的 Luria-Bertani(LB) 琼脂培养基上进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆于 含 Amp 的 LB 液体培养基(2~3 mL)中培养;菌液 PCR 扩增反应后,将含目的片段的菌液送至生工 生物工程(上海)股份有限公司进行序列分析。

1.3 目的基因的 cDNA 和 DNA 克隆

利用 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒(日本 TaKaRa 公司)并参照其操作说明分别反转录合成 5'-RACE 和 3'-RACE 的 cDNA 第一链。根据验证的 contig 序列,同样在线设计 5'-及 3'-RACE 的 基因特异性引物各 2条: 5'RACE1和 5'RACE2 以及 3'RACE1和 3'RACE2。通过 RACE 技术获得 cDNA 的 5'-和 3'-末端序列。

5'-RACE 的第一轮 PCR 反应体系包含 12.5 μL 的 2×Taq PCR Master Mix, 9.5 μL 的无 RNA 酶去

离子 H₂O, 1 μL 5'-RACE 的 cDNA 第一链反应液 作为模板, 1 μL 的引物 5'RACE1(表 1), 1 μL 的引 物 UPM(试剂盒中)。第二轮巢式 PCR 的反应包含 2 μL 第一轮 PCR 产物, 引物为 5'RACE2 (表 1)和 试剂盒中的 NUP, 其他组分同第一轮反应。退火 温度分别是 71 ℃和 70 ℃ (表 1)。

3'-RACE 反应体系基本上同 5'-RACE。在第 一轮 PCR 反应体系中将引物及模板分别改成 3'RACE1(表 1)及 3'-RACE 的 cDNA 第一链;在第 二轮巢式 PCR 反应体系中,将引物及模板分别改 成 3'RACE2 (表 1)及第一轮 PCR 产物。反应程序 也基本上同 5'-RACE,但退火温度分别为 70 ℃ 和 72 ℃ (表 1)。

将获得的 5'-和 3'-末端序列与验证的 contig 序列进行拼接,得到该基因的 cDNA 全长序列,设计引物进行序列验证。

引物 primer	序列(5'-3') nucleotide sequence (5'-3')	退火温度/℃ annealing temperature	
cDNA 克隆 cDNA cloning			
17194F	ATGCCTTACCTATCGGCTAGG	65	
17194R	TGTAAGCACGCGCCACAA		
RACE 克隆 RACE cloning			
5'RACE1	GCCACCAGGCTTGTACTGATACTGCTTC	71	
5'RACE2	CCTAGCCGATAGGTAAGGCAT	70	
3'RACE1	AGCCAACTATGCGCTCGTCATCCT	70	
3'RACE2	CCGCACTTTTGGGGGCACACACCT	72	
DNA 克隆 DNA cloning			
D1F	ATGCCTTACCTATCGGCTAG	60	
D1R	GTGAGCGTGATCAAGTTG		
D2F	CAACTTGATCACGCTCAC	61	
D2R	GCTTGCCATCCAGGCAGT		
D3F	ACTGCCTGGATGGCAAGC	66	
D3R	AGGTCTAGCGACGCAGCG		
D4F	GGGTGCCATCCTCATGCTGG	67	
D4R	TCAGCGGCCAGCCACG		
D5F	ATGCCTTACCTATCGGCTAG	64	
D5R	TCAGCGGCCAGCCACG		
大肠杆菌中的异源表达 heterologous expression in Escherichia coli			
eEcoRIF	gaatteATGCCTTACCTATCGGCTAG*	71	
eNotIR	gcggccgcGCGGCCAGCCACGCCGTC [*]		

表 1 本研究所用到的引物及其序列

 Tab. 1
 Nucleotide sequence of primers employed in the present study

注:*小写字母为内切酶 EcoR I 和 Not I 的酶切识别位点.

Note: * the lowercase letters denote the recognition sites of EcoR I and Not I.

使用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) 方法从缺刻缘绿藻细胞中提取 DNA^[13]。基于 *MiEPT*的 cDNA 全长序列分段设计 5 对引物(D1F 和 D1R、D2F 和 D2R、D3F 和 D3R、D4F 和 D3R 以及 D5F 和 D5R,表 1),以缺刻缘绿藻的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和 程序同 contig 序列的验证反应,但各对引物的退 火温度见表 1。

将获得的目的片段序列拼接后得到 *MiEPT* 的 DNA 序列,并利用 NCBI 的 SPIDEY 程序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideyweb.cgi)比对其 cDNA 全长序列以确定内含子的位置。

1.4 生物信息学分析

使用 ORF 查找器(http://www.ncbi.nlm.nih. gov/gorf/gorf.html)在线预测 *MiEPT*序列的开放阅 读框(ORF);使用网站 NCBI (http://www.ncbi.nlm. nih.gov/protein/?term=ept)将 *MiEPT*的 ORF 翻译 成氨基酸序列;使用 ComputepI/MW (http://cn. expasy.org/tools/pi_tool.html)软件预测由 *MiEPT* 所编码蛋白质的等电点、分子量;使用 Phobius (http://phobius.sbc.su.se/)、TMHMM Server v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)、

Tmpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED form.html), SingalP 3.0 Server (http://www.cbs.dtu. dk/services/SignalP/)、ChloroP 1.1 Server (http:// www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/) 等软件预测蛋 白质的跨膜区、信号肽和转运肽;使用 Protscale (http://web.expasy.org/protscale/)和 Predict Protein (http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/)等软件 预测蛋白质的疏水性;使用InterProscan Sequence Search (http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequencesearch), SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/), Phyre (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre)等软件预 测蛋白质的功能位点、二级结构等。从 NCBI 网 站中下载藻类和其他物种的 EPT 氨基酸序列, 使 用 BioEdit 软件对部分 EPT 的氨基酸序列进行多 序列比对,并使用 MEGA7 软件的邻接(neighborjoining)法进行聚类。

1.5 原核表达质粒的构建

根据 MiEPT 的 ORF 序列、克隆质粒 pEASYR

及表达质粒 pET-23a (美国 Novagen 公司)多克隆 位点的序列设计带酶切识别位点的引物 eEcoRIF 和 eNotIR(表 1),利用 PCR 技术扩增到 *MiEPT* 带 酶切识别位点的 ORF 片段。25 µL 反应体系除引 物外同 contig 序列的验证反应。PCR 反应程序也 与 contig 序列的验证反应。PCR 反应程序也 与 contig 序列验证的基本一致,但退火温度为71 ℃。 PCR 产物按上述方法经过胶回收、TA 克隆后,构 建携带目的片段的克隆质粒 pEASYR-MiEPT。

从测序正确的菌液中抽提质粒 pEASYR-MiEPT,用限制性内切酶 *Eco*R I和 *Not* I分别对其 及表达质粒 pET-23a 进行双酶切反应,37 ℃反应 4 h。酶切反应体系包含:2 µL 的 10 × K 缓冲液、 6 µL 的 pEASYR-MiEPT 或 pET-23a、1 µL 的 *Not* I、 1 µL 的 *Eco*R I及 10 µL 的去离子 H₂O。胶回收酶 切后的目的片段,经 T4 DNA 连接酶连接得到重 组表达质粒 pET-MiEPT。连接反应体系为:1 µL 的目的基因片段、7 µL 的 pET-23a 片段、1 µL 的 T4 DNA 连接酶及 2.5 µL 的 10 × K 缓冲液,然后 加去离子 H₂O 至 25 µL。将连接后的产物按照上 述方法转化到大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞。

利用质粒提取试剂盒从测序正确的菌液中抽 提 pET-MiEPT, 经 *Eco*R I和 *Not* I 双酶切反应验 证后,分别将 pET-MiEPT 和空质粒 pET-23a (作阴 性对照)转化大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 的感受态 细胞(北京全式金生物技术有限公司)。培养、筛 选并吸取阳性克隆的菌液进行 PCR 验证,将验证 后携带目的基因的菌液送至生工生物工程(上海) 股份有限公司测序。

1.6 重组蛋白的诱导表达、分离与纯化

将携带 pET-MiEPT 的菌液按 1:1000 (菌液: LB液体培养基,体积比)的比例接种于LB液体培养基中,在 37 ℃下以 200 r/min 的转速振荡活化培养 10~12 h;再按 1:100(活化菌液: LB液体培养基,体积比)的比例,将活化的菌液接种于含有 100 μg/mL Amp 的 LB培养基中,在 37 ℃下振荡培养至菌液的 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8;添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)和氯霉素至终浓度分别为 0.1 mmol/L 和 35 mg/L,在 25 ℃下以 200 r/min的速度振荡培养,以诱导目的蛋白的表达。

取不同诱导时间培养的菌液在 4 ℃下, 以

7000 r/min 的转速离心 5 min,并将收集的菌体用 含有 5 µg/mL 亮肽素和 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟的 50 mmol/L Tri-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬。取 50 µL 重悬全菌与 2×蛋白上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L 的二硫苏糖醇,4% SDS, 20%甘 油,0.2%溴酚蓝,pH 6.8)以 1:1 的比例混合,沸 水中煮 10 min,留样保存。利用十二烷基硫酸钠 (SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测重组蛋白 的诱导表达情况。将重悬全菌在-20 ℃中冷冻, 常温溶解后,超声破碎至溶液透亮。按照 Horibata 等^[14]的方法,在4 ℃下、以 14000 r/min 的转速离 心 10 min,去除细胞碎片,收集上清液;再在4 ℃ 下、用 CP70MX 超速离心机(日本 Himac 公司)以 35000 r/min 的转速离心 60 min,获得上清液(即含 纯化的重组蛋白)和沉淀部分。

1.7 Western 印迹分析

利用 SDS-PAGE 对上述蛋白样品进行凝胶电泳 并利用抗聚 His 标签的抗体进行 Western 印迹, 分 析转基因菌株中目标蛋白的表达情况。Western 印 迹按照陈晶等^[15]的方法操作。将蛋白质从凝胶中 电转至硝酸纤维素(NC)膜上;用 TBST (0.137 mol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 0.025 mol/L Tris, pH 7.4, 用前加入 0.05%的吐温 20)溶液洗涤 3次;用封闭 液(TBST 配制的 5%脱脂奶粉)封闭洗涤的 NC 膜 1 h, 然后再用 TBST 溶液洗涤 3 次; 加入用封闭 液稀释(稀释 2000 倍)的抗聚 His 标签鼠单克隆 抗体(上海友科生物科技有限公司),在常温下, 摇床平缓摇动1h,再用 TBST 溶液洗涤3次;加 入用封闭液稀释(稀释 4000 倍)的辣根过氧化物 酶标记的羊抗鼠二抗(上海友科生物科技有限公 司), 孵育 1 h, TBST 溶液洗涤 3 次; 最后使用 SuperSignalTM West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)显色, 并利用 Amersham Imager 600(美国 GE 公司)拍照 保存。

1.8 重组蛋白酶活性的定性与定量分析

利用上述自大肠杆菌中分离纯化的重组 MiEPT (rMiEPT)进行酶活性的定性分析。参照文 献[14]构建 rMiEPT 的体外酶活反应体系: 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0), 5 mmol/L MnCl₂, 1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L DAG, 0.002% (W/V)吐温 20, 5 µg 纯化蛋白和 20 µmol/L CDP-乙醇胺或 200 µmol/L CDP-胆碱。在 30 ℃下孵育 10 min 后, 添加 600 µL 氯仿-甲醇(1:1, V/V)和 300 µL 0.9% 的 KCl溶液以终止反应。将混合溶液以 12000 r/min 的转速离心 5 min, 抽提有机相并用氮气吹干, 加 10 µL 氯仿以溶解; 在硅胶 60 F254 的薄层层析 (thin-layer chromatography, TLC)板(德国 Merck 公 司)上点样, 置于氯仿:甲醇:水(65:35:8, V/V/V)的展开剂中展开。然后取出 TLC 板, 硫酸 铜溶液显色, 置于 180 ℃烘箱烤 5 min。自转空载 体 pET-23a 的菌株中纯化的蛋白作为空载体对照; 利用重悬蛋白缓冲液作为阴性对照。

鉴于有些 EPT 能分别将 CDP-乙醇胺和 CDP-胆碱合成为 PE 和 PC, 但 EPT 对这 2 种底物存在 着偏好性^[6], 为了解 MiEPT 的催化性质, 本研究 使用 IatroscanTM MK-6S 棒状薄层色谱分析仪 (日本雅特隆公司)定量检测在上述同等体外酶反 应条件下所产生的产物量。仪器的氢气流速为 160 mL/min, 空气流速调至 2 L/min。用取样器取 5 µL 的样品,分 5~6 次点在色谱棒原点处,将其 用氯仿:甲醇:水(70:30:3、V/V/V)进行展开, 待展开到100mm处,拿出色谱棒架,放入干燥器 烘 3 min。烘干冷却至室温后, 放入仪器, 进行扫 描。利用"样品峰面积×标样摩尔数/标样峰面积"来 计算产物的摩尔数,其中,标样摩尔数=(标样浓 度×标样上样量)/标样的相对分子质量。酶活性= 产物的摩尔数/(蛋白量×反应时间),结果表示成3 次独立实验的平均值±标准差(\bar{x} ±SD)。

2 结果与分析

2.1 缺刻缘绿藻 EPT 的克隆

自缺刻缘绿藻高通量转录组数据库^[10]中筛选 到1条长为911 bp且与莱茵衣藻EPT序列(GenBank 登录号: XP_001692856.1)有51.48%一致性的序列 (contig17194_8),据此设计 1 对引物 17194F 和 17194R(表1),并以合成的cDNA为模板进行PCR 扩增,获得并验证了长为720 bp的片段(图 2a 泳 道 1)。根据验证的序列,设计了4条引物(5'RACE1 和 5'RACE2 以及和 3'RACE1 和 3'RACE2)(表 1), 利用 RACE 技术, 分别经过 2 轮 PCR 扩增并测序, 获得长分别为 238 bp 和 1137 bp 的该基因 5'-及 3'-末端序列(图 2a 泳道 2 和泳道 3)。将它们与验证 的长为 720 bp 片段的序列进行手工拼接, 并重新 设计引物进行 PCR 扩增验证后,获得了一条长为 1914 bp 的 cDNA 序列, 它由 1164 bp 的开放阅读 框(ORF)、217 bp 的 5'-非翻译区(UTR)和 533 bp 的 3'-UTR 组成(图 2b)。该基因的 ORF 编码由 387 个氨基酸组成的蛋白。NCBI 的 BLASTp 搜索结 果显示,该基因所编码蛋白与来自 *Coccomyxa subellipsoidea* C-169 的 EPT (GenBank 登录号 XP_005646944)及莱茵衣藻的 EPT 分别具有 57.77%和 48.8%的一致性。因而,将自缺刻缘绿 藻克隆得到的该基因命名为 *MiEPT*。

根据 *MiEPT* 的全长 cDNA 序列,设计 5 对引物(D1F 和 D1R、D2F 和 D2R、D3F 和 D3R、D4F和 D3R 以及 D5F 和 D5R,表 1),以缺刻缘绿藻的

基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 其产物经测 序可知,长分别为 248 bp、479 bp、410 bp、224 bp 和 2103 bp(图 2a 泳道 4~8)。其中, 在利用引物对 D5F和D5R进行扩增时,其产物的电泳图谱显示, 除 2103 bp 的目的条带外,还存在 1 条长约 750 bp 的弱带(图 2a 泳道 8), 经测序后发现它是非特异 性扩增的产物。对这些目的产物的序列进行手工 拼接和重新设计引物验证后,获得 MiEPT 长为 2853 bp 的 DNA 序列。将其与相应的 cDNA 序列 进行比对,结果显示 MiEPT 的 ORF 被 6 个内含子 隔开(图 2b), 这些内含子的长度从 5'端开始, 分 别为 255 bp、87 bp、97 bp、86 bp、278 bp 和 136 bp, 从而将 ORF 分割为 7 个外显子(图 2b)。 序列分析结果表明,所有内含子的序列均符合 "GT-AG"剪接规则。该基因的 cDNA 和 DNA 序列 已提交 GenBank, 它们的登录号分别为 MT649181 和 MT649182。



图 2 MiEPT 基因克隆相关扩增产物的电泳图和基因结构示意图

a. *MiEPT*的 cDNA 及 DNA 克隆产物的电泳图. M: DL 2000 DNA 分子标准品; 泳道 1: 17194F/R 引物对的 PCR 扩增产物; 泳道 2: 5'-RACE第二轮巢式 PCR 扩增产物; 泳道 3: 3'-RACE第二轮巢式 PCR 扩增产物; 泳道 4-8: 分别利用引物对 DNA1F/R、 DNA2F/R、DNA3F/R、DNA4F/R 和 DNA5F/R 进行的 PCR 扩增产物. b. *MiEPT* 的基因结构示意图.

灰线代表非翻译区;黑线代表内含子;黑色矩形框代表外显子.

Fig. 2 Electrophoretogram of the amplified products for *MiEPT* cloning and a structure diagram of this gene a. Agarose gel electrophoretogram of amplified products generated from the cDNA and DNA cloning of *MiEPT*. M: DL 2000 DNA standard marker; Lane 1: amplified product using the primer pair 17194F/R; Lane 2: amplified product of 5'-RACE; Lane 3: amplified products of 3'-RACE; Lanes 4–8: amplified products using the primer pairs DNA1F/R, DNA2F/R, DNA3F/R, DNA4F/R and DNA5F/R, respectively. b. A structure scheme of this gene *MiEPT*. The black boxes represent exons; a total of 6 introns are indicated in black lines; gray lines represent the un-translated region (UTR).

2.2 MiEPT 的特征分析

经 ComputepI/MW 等软件预测可知, MiEPT

所编码蛋白的分子量为 42.2 kD, 等电点为 8.15, 无信号肽及转运肽。phyre 在线预测结果显示,

MiEPT 二级结构可能存在 15 个 α-螺旋区域。一 般来说, 20 个以上残基所形成的 α-螺旋疏水肽段 更易于形成跨膜区^[16]。鉴于此,作者推测 MiEPT 有 8 个跨膜区(图 3 下划线部分)。这个推测与利 用 TMHMM Server v.2.0 程序对 MiEPT 进行跨膜 区的预测结果基本一致,从而预示着 MiEPT 可能 为膜整合蛋白,与 McMaster 等^[6]对不同物种 EPT 的总结相吻合。

InterPro的蛋白结构域预测结果显示,MiEPT 属于 CDP-醇磷脂酰转移酶家族 (Pfam 登录号: PF01066),为胆碱或乙醇胺磷酸转移酶(C或 EPT)。 使用 BioEdit 软件对来自缺刻缘绿藻、胶球藻 C-169、莱茵衣藻、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和人(Homo sapiens)的 EPT 蛋白序列进行比 对,结果显示 MiEPT 与衣藻 EPT^[8]及 CDP-氨基醇 磷脂酰转移酶家族相关成员^[6]都存在一个 CDP-醇 磷脂酰转移酶基序: DG(X)₂AR(X)₈G(X)₃D(X)₃D (图 3 方框部分)。

EPT 和胆碱磷酸转移酶(cholinephosphotransferase, CPT; EC 2.7.8.2)统称为氨基醇磷酸转移酶 (aminoalcoholphosphotransferase, AAPT)。高等植 物如大豆(*Glycine max*)^[17]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[18]、白菜(*Brassica campestris* var. *pekinensis*)^[19]和小麦(*Triticum aestivum*)^[20]的 AAPT 都能将 CDP-乙醇胺和 CDP-胆碱分别合成为 PE 和 PC。基于此,作者选择了包括本研究在内的 6 种绿藻的 EPT 以及一些高等植物的 AAPT 等蛋白 序列,构建了一个无根的系统发育树。结果显示, 绿藻、酵母以及高等植物明显分属于不同的分支 (图 4),与传统的分类系统相吻合,达到靴带值为

缺刻缘绿藻 M. incisa	MPYLSAR	7
胶球藻 C. subellipsoidea C-169(XP_005646944)	MVKVLSPR	8
莱茵衣藻 C. reinhardtii (XP_001692856)	MVKVLSPR	8
酿酒酵母 S. cerevisiae (AAA63572)	MVKVLSPR	8
人 H. sapiens (AAD25170)	M	46
ALKGLKQYQYKPGGYTKLDD-LHQPFWNWAVT	LFPMWVAPNLITLTGIGGLVVAYLLTAVYSPELSGEMPRWVYFLNGF	85
ALEGLKNYVYKPGGYTWLDH-AHTPFWNWLTA	QLPMWLAPNLITLVGLIVTFIAYGTMWYYLPEYTGEGPRWPYFFAGV	86
ALEGLKNYVYKPGGYTWLDH-AHTPFWNWLTA	QLPMWLAPNLITLVGLIVTFIAYGTMWYYLPEYTGEGPRWPYFFAGV	86
HIENLKSYKYQSEDRSLVSKYFLKPFWQRFCH	IFPTWMAPNLITLSGFAFIVINVLTVFYYDPNLNTDTPRWTYFSYAL	87
QLKRLEEHRYQSAGRSLLEP-LMQGYWEWLVR	RVPSWIAPNLITIIGLSINICTTILLVFYCPTATEQAPLWAYIACAC	124
ACLAYMHLDCI DGKQARRTKTSSPLGQLFDHG SILVYTNLDCI DGKQARRTGTSSPLGQLFDHG SILVYTNLDCI DGKQARRTGTSSPLGQLFDHG GVFLYQTFVGSDGVHARRINQSGPLGELFDHS GLFIYQSLDAI DGKQARRTNSSSPLGELFDHG	CDALSVQLIVTAIAASLDLGV-SKIAVGGAMAILVPWILAHWEEYHT CDAVALHVMLSLVQASLAEPP-SVFASVAAMSVYLPWWVSHWEEYHT CDAVALHVMLSLVQASLAEPP-SVFASVAAMSVYLPWWVSHWEEYHT IDAINSTLSIFIFASETGMGF-SYNLMLSQFAMLTNFYLSTWEEYHT CDSLSTVFVVLGTCIAVQLGTNPDWMFFCCFAGTFMFYCAHWQTYVS	163 164 164 165 203
GNMLYGNGYWGLTEANYALVILHFATAAFGPH	FWGTHLSSLVHMKLPID <u>VTVKESLLLAVSIFASMQVAGQLWRVLT</u> GR	242
GVLMYGDGNFGILEANYVLALVTFITGTFGPA	VWDTPMRSIVPV-FPWDTSVKHAFIVFAMCIAVIQNYGQLYRVFSRH	242
GVLMYGDGNFGILEANYVLALVTFITGTFGPA	MWDTPMRSIVPV-FPWDTSVKHAFIVFAMCIALIQNYGQLYRVFSRH	242
HTLYLSEFSGPVEGILIVCVSLILTGIYGKQV	IWHTYLFTITVGDKVIDVDTLDIVFSLAVFGLVMNALSAKRNVDKYY	244
GTLRFGIIDVTEVQIFIIIMHLLAVIGGPP	FWQSMIPVLNIQMKIFPALCTVAGTIFSCTNYFRVIFTGG	273
HPPLPAPERGHKQLGSGHAASHLAQVVLILGL	GAILMLEPASAHGQARVVVATYGLVYALEATKLIMDHMAKEPFEI	319
WTMLPEAERGHKELGNASRLTHLASGAALIFL	GAVYLADNKLQPGQARLAGLLYGLVYAIVATQLIMDHMCKEPFRS	319
WTMLPEAERGHKELGNASRLTHLASGAALIFL	GAVYLADNKLQPGQARLAGLLYGLVYAIVATQLIMDHMCKEPFRS	319
RNSTSSANNITQIEQDSAIKGLLPFFAYYASI	ALLVWMQPSFITLSFILSVGFTGAFTVGRIIVCHLTKQSFPM	318
VGKNGSTIAGTSVLSPFLHIGSVITL	AAMIYKKSAVQLFEKHPCLYILTFGFVSAKITNKLVVAHMTKSEMHL	346
TWWPVALLVVYIINNRL-LLVP <u>AAP</u>	LAWIILAITMAGYVQYVTAVCGEICAY <mark>L</mark> GINCLTIRKADGVAGR-	387
PLLPLAVLTVAAANSVL-QLLDARA	TAATLAGAMIVYYLVYVTTIVDQVCAYLGIKCLTITPKRA	383
PLLPLAVLTVAAANSVL-QLVDARA	TAATLAGAMIVYYLVYVTTIVDQVCAYLGIKCLTITPKRA	383
FNAPMLIPLCQIVLYKICLSLWGIESNKIVFA	LSWLGFGLSLGVHIMFMNDIIHEFTEYLDVYALSIKRSKLT	391
HDTAFIGPALLFLDQYFNSFIDEYI	VLWIALVFSFFDLIRYCVSVCNQIASHLHIHVFRIKVSTAHSNHH	416
图 3	EPT 蛋白的多重同源序列比对	

保守的氨基酸用黑色阴影表示; 75%一致性的氨基酸用灰色阴影表示;

体引的风空的加密化的,2010年的风空的风空的风空的风空的水分,

预测的 CDP-醇磷脂酰转移酶结构域用方框表示;预测的跨膜区用下划线表示.

Fig. 3 Multi-sequence alignment of several EPTs based on their deduced amino acids

The conserved amino acids are shaded in black; 75% homologous amino acids are shaded in grey;

a predicted CDP-alcohol phosphotransferase motif is highlighted by a box; and the transmembrane regions are underlined.



numbers are presented in the parentheses after the Latin names of each species. The position of MiEPT is marked by an arrow.

100%的支持;本研究自缺刻缘绿藻克隆的*MiEPT* 所编码蛋白与已进行功能鉴定的莱茵衣藻 EPT 聚 为一支(图 4),尽管靴带值仅为 88%,但两者具有 48.8%的一致性及共有的 CDP-醇磷脂酰转移酶基 序(图 3),预示着自缺刻缘绿藻克隆的 *MiEPT* 基 因所编码的蛋白可能具有 EPT 的功能。

2.3 重组表达质粒 pET-MiEPT 的构建与转化

在 MiEPT 的生物信息学基础上,设计带酶切 识别位点的引物 eEcoRIF 和 eNotIR (表 1),以缺刻 缘绿藻的 cDNA 为模板,扩增到 1 条长约 1200 bp 的产物带(图 5 泳道 1)。经克隆测序可知,它由 *MiEPT* 长为 1161 bp 的 ORF 序列及 14 bp 用于酶 切识别位点的碱基组成,因而系目的基因的片 段。将该产物连接至克隆质粒 pEASYR 上以构建 携带目的基因的克隆质粒 pEASYR-MiEPT。再用 *Eco*R I 和 *Not* I 分别双酶切 pEASYR-MiEPT (图 5 泳道 2)及表达质粒 pET-23a (图 5 泳道 3),连接目 的片段以构建重组表达质粒 pET-MiEPT。提取该 表达质粒,经*Eco*R I 和 *Not* I 的双酶切反应,其产 物经电泳检测(图 5 泳道 4)和序列分析,只出现目的基因大小(1175 bp)和载体序列大小(3640 bp)的



图 5 重组表达载体 pET-MiEPT 构建过程中 相关产物的电泳图

泳道 1: 带有酶切识别位点的引物扩增到 *MiEPT* 的 ORF 产物; 泳道 2-4: 分别为 pEASYR-MiEPT、空载体 pET-23a

- 及重组表达质粒 pET-MiEPT 的双酶切产物; M1 和 M2:
 - 分别为 DL2000 及 Marker IV 的 DNA 分子量标准.
- Fig. 5 Electrophoresis profiles of MiEPT recombinant expression vector construction

Lane 1: amplified product of MiEPT with primers containing restriction recognition sites; lanes 2–4: double digested product of pEASYR-MiEPT, pET-23a and pET-MiEPT with *Eco*R I and *Not* I; M1 and M2: DL 2000 and marker IV DNA molecular weight standard. 片段,表明已经成功地构建了重组表达质粒 pET-MiEPT。将该重组的质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞,筛选到转基因细胞系 ET-MiEPT-BL。

2.4 重组 MiEPT(rMiEPT)的诱导表达与分离、 纯化

将转目的基因的菌株 ET-MiEPT-BL 经扩大培 养并添加 IPTG 和氯霉素后,收集不同诱导培养 时间的菌体,其全菌蛋白经电泳显示:与携带空 载体 pET-23a 的菌株 ET-BL(图 6 泳道 1)相比,菌 株 ET-MiEPT-BL 在诱导培养 0 h、2 h、4 h、6 h 时(图 6 泳道 2、3、4 和 5),在约 45 kD 处出现 1 条随诱导时间延长而表达量增加的条带,预示它 可能是诱导表达的目的蛋白。在重组表达质粒 pET-MiEPT 的构建过程中,因在插入目的片段的 上游存在一个 T7-Tag,下游存在编码 6 个 His 的 序列以及 pET-23a 质粒上携带适用于其他酶切识 别位点的序列,这些序列编码 26 个氨基酸,使得 重组蛋白 MiEPT 的预测分子量为 45.1 kD,与图 6 泳道 2~5 中新出现的那条带大小吻合,这样就从 蛋白大小角度说明该条带是目的基因编码的蛋 白。另外,在重组表达质粒 pET-MiEPT 构建时, 由于在 MiEPT 的羧基端融合表达了聚 His 标签, 因此可以利用商业提供的多聚 His 标签抗体对转 基因菌株的全菌蛋白进行 Western 印迹分析。免 疫印迹图谱(图 6 泳道 13)上只出现单一信号,它 正好位于与 His 标签融合表达蛋白的预测分子量 大小(45.1 kD)一致的地方,说明这条 45.1 kD 蛋 白带有聚 His 标签。综上所述,本研究利用表达 质粒 pET-23a 在大肠杆菌中成功地实现了膜蛋白 MiEPT 的重组表达。



图 6 重组目的蛋白诱导表达(a)及纯化过程(b)中相关产物的电泳图谱和 利用抗聚组氨酸标签的抗体进行 Western 印迹图谱(c)

箭头所指即为目的蛋白条带. M1: 预染蛋白分子量标准(Fermentas 公司); M2: 预染蛋白分子量标准(全式金生物科技公司); 泳道 1: 转空载体 pET-23a 菌株的全菌蛋白; 泳道 2-5: 转目的基因菌株经 IPTG 分别诱导培养 0 h、2 h、4 h、6 h 时的全菌 蛋白; 泳道 6 和 7: 分别为转目的基因和转空载体菌株超速离心后的上清液; 泳道 8: 转目的基因菌株经 IPTG 诱导培养 4 h 时的全菌蛋白; 泳道 9 和 10: 分别为转目的基因菌株高速离心后的上清液和沉淀部分; 泳道 11 和 12: 分别为转目的基因菌 株超速离心后的上清液和沉淀部分; 泳道 13: 利用抗聚 His 标签的抗体对转目的基因菌株的全菌蛋白进行的 Western 印迹. Fig. 6 Electrophoresis profiles of expressed (a) and purified (b) recombinant MiEPT and

its Western blotting pattern with anti-His-tag antibody (c)

The target protein of MiEPT is marked by an arrow. M1: PageRuler[™] prestained protein ladder (Fermentas); M2: prestained protein molecular weight standard (TransGen Biotech); lane 1: the whole cell protein of *E. coli* BL21 carrying empty vector pET-23a; lanes 2–5: the whole cell protein of *E. coli* BL21 carrying pET-MiEPT induced by IPTG for 0 h, 2 h, 4 h, and 6 h, respectively; lanes 6 and 7: the supernatant fractions of *E. coli* BL21 carrying pET-MiEPT induced IPTG for 4 h; lanes 9 and 10: the supernatant and precipitated fractions, respectively, of *E. coli* BL21 carrying pET-MiEPT after high-speed centrifugation; lanes 11 and 12: the supernatant and precipitated fractions, respectively, of *E. coli* BL21 carrying pET-MiEPT after ultracentrifugation; lane 13: Western blot of the whole cell protein of *E. coli* BL21 carrying pET-MiEPT with anti-His tag antibody.

从图 6 泳道 2~5 中目的蛋白条带的强弱变化 可以发现,添加 IPTG 诱导培养 4 h,转基因菌株 ET-MiEPT-BL 中目的蛋白的表达量最大。因此, 将该转基因菌株诱导培养4h后,收集菌体,冻融 后超声破碎细胞。高速离心后,经电泳检测发现 目的蛋白主要存在于上清液中(图6泳道9),而沉 淀中该蛋白条带的颜色相对较弱(图 6 泳道 10)。 然后取上清液,再经超速离心,经电泳检测发现 沉淀中缺乏该大小的条带(图 6 泳道 12),而目的 蛋白条带存在于上清液(图 6 泳道 11),且该目的 蛋白条带是离心纯化蛋白中条带颜色最深的(图 6 泳道 6 和 11)。经 ImageJ 软件的灰度分析可知,它 约占总蛋白的 44%,说明 rMiEPT 是离心纯化后 上清液总蛋白的主要部分。相比较而言,只含有 空载质粒 pET-23a 大肠杆菌的细胞破碎液,经超 速离心后电泳检测,没有出现同样大小的条带(图 6泳道 7)。因此,收集自转基因菌株 ET-MiEPT-BL 的细胞裂解液经超速离心后的上清液,即获得部 分纯化含重组 rMiEPT 的组分。

2.5 rMiEPT 的酶活性分析

将 CDP-乙醇胺及 DAG 作为反应物构建体外 反应体系,添加超速离心纯化的 rMiEPT 进行酶 促反应,利用 TLC 分析酶促反应后的产物。结果 显示,在添加 rMiEPT 的反应体系中,产生1条与 PE 相应的条带(图 7a 泳道 1),而在添加自转带空 载体的菌株 ET-BL 中所纯化的组分和阴性对照(图 7a 泳道 2 和 3)中均未出现这条带。表明 rMiEPT 能将 CDP-乙醇胺上的磷酸乙醇胺转移至 DAG 甘 油骨架的 sn-3 位上,从而产生 PE,即具有 EPT 的 酶活性。鉴于有些 EPT 也能作用于 CDP-胆碱以 合成 PC^[6],本研究同时构建含 CDP-胆碱作为底 物的酶促反应体系;其反应产物的 TLC 结果显示, rMiEPT 也能将 CDP-胆碱及 DAG 合成为 PC,从 而表现出 CPT 的酶活性(图 7a 泳道 4);但与产物 PE 的条带相比,PC 的条带似乎较弱(图 7a 泳道 4 对比 1)。由此认为,rMiEPT 既具有 EPT 的功能, 也具有 CPT 的功能,但 EPT 的活性似乎较强。

为了解 rMiEPT 对 CDP-乙醇胺及 CDP-胆碱 的偏好性,本研究利用棒状薄层色谱分析仪定量 分析了除底物(CDP-乙醇胺和 CDP-胆碱)外,其他 同等条件下,体外酶促反应的产物量。结果显示, 当用 CDP-乙醇胺作为底物时,rMiEPT 的酶活性 为 0.64 nmol/(mg prot·min);而用 CDP-胆碱作为 底物时,其活性显著(P<0.01)低于前者,只有



图 7 rMiEPT 酶活性的定性(a)与定量(b)分析

a. rMiEPT体外酶促反应产物的薄层色谱图. PE和PC分别为磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱的标准品; 泳道1和4: 添加了rMiEPT的反应产物; 泳道2和5: 添加了来自转空载体 pET-23a 菌株的纯化蛋白的反应产物; 泳道3和6: 添加了重悬蛋白缓冲液作为空白对照的反应产物. b. rMiEPT体外酶促反应活性的定量分析结果. PE: CDP-乙醇胺作为反应物; PC: CDP-胆碱作为反应物. Fig. 7 Qualitative (a) and quantitative (b) analyses of rMiEPT enzyme activity

a. Thin layer chromatograms of *in vitro* reaction products of recombinant *MiEPT*. PE and PC: phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine standards, respectively; lanes 1 and 4: product generated with addition of rMiEPT; lanes 2 and 5: product generated with addition of the purified proteins from *E. coli* BL21 carrying empty vector pET-23a; lanes 3 and 6: product generated with addition of buffer solution as a control instead of the purified rMiEPT. b. Quantitative detection of rMiEPT enzyme activity. PE: produced PE using CDP-ethanolamine as a reactant; PC: produced PC using CDP-choline as a reactant.

0.062 nmol/(mg prot·min) (图 7b);即 rMiEPT 所表 "⁴ 现的 EPT 酶活性是 CPT 的 10.3 倍。这个结果表 ⁵ 明,在相同的条件下,rMiEPT 更倾向利用 CDP- ⁷

3 讨论

乙醇胺合成 PE。

本研究根据从缺刻缘绿藻转录组的文库数据 库^[10]中筛选到1条与莱茵衣藻EPT序列有51.48% 一致性的 contig 序列设计引物,克隆得到编码缺 刻缘绿藻EPT 的基因 *MiEPT*。它具有7个外显子 (图 2b),与莱茵衣藻的 *CrEPT*^[8]一样。跨膜区预测 结果显示,MiEPT 可能具有8个跨膜区(图 3),与 人^[14]和酵母^[21]的 EPT1 预测结果(均含有7个跨 膜区)也基本吻合;其中,前3个跨膜区有可能系 DAG 结合的结构域^[22-23]。由此推测,*MiEPT* 所编 码蛋白应是一个膜整合蛋白。

众所周知, 真核生物膜蛋白的异源表达与纯 化是目前蛋白质生物化学及生物物理学研究的一 个技术瓶颈^[24-26]。因而, 能否通过原核表达系统 来实现 MiEPT 的表达, 是本研究要解决的第一个 难题。在本研究的开始阶段, 我们试图利用表达 载体 pET-32a 和 pET-28a 来达到原核表达 MiEPT 的目的, 但转基因菌株的全菌蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测, 均未显示出目的蛋白大小的条带(数据 未提供), 说明利用这两个载体不适合在大肠杆菌 中表达 MiEPT。Horibata 等^[14]利用表达载体 pET-23a 成功地在大肠杆菌中表达了人的 EPT1, 为本研究提供了借鉴。按照 Horibata 等^[14]的方法, 本研究构建了重组表达载体 pET23a-MiEPT(图 5), 并在大肠杆菌中达到了异源表达 MiEPT (图 6)的 目的。

如何分离纯化到 rMiEPT 这种重组的膜蛋白, 是本研究要解决的另一个问题。表达载体 pET-23a 中含有 1 个由 6 个 His 所组成的标签,理论上应 能利用 Bio-ScaleTM Mini ProfinityTM IMAC Cartridges 等镍柱(美国 Bio-Rad 公司)进行亲和层析以 达到纯化的目的^[27]。但在亲和层析以纯化 rMiEPT 的实际操作时,其洗脱液经 SDS-PAGE 电泳检测 (数据未提供),没有发现目的蛋白的条带。这可能 是由于目的蛋白的不正确折叠造成聚 His 标签被 "包埋"而没有暴露出来,以致难以与层析柱的介质结合,这个推论还有待证实。因而,本研究采用了超速离心方法^[14],纯化含 rMiEPT 的膜组分。由于超速离心难以像亲和层析技术那样非常明确地获得组分比较单一的目的蛋白,因而在 SDS-PAGE 的电泳图谱(图 6 泳道 6 和 11)中,出现了一些非目的蛋白条带。但经 ImageJ 软件的灰度分析可知,目的蛋白的相对含量达到总蛋白的 44%,表明 rMiEPT 是纯化后膜蛋白的主要组分;况且,转空载 pET-23a 菌株细胞裂解液经超速离心后的上清液中,经电泳检测没有出现目的蛋白大小的条带(图 6 泳道 7)。这些结果表明,本研究利用超速离心技术获得了部分纯化含 rMiEPT 的膜组分。

多序列比对结果显示, MiEPT 具有 CDP-醇磷 脂酰转移酶家族的特征性保守序列——CDP-醇 磷脂酰转移酶基序(图3), 它在磷酸转移的催化反 应中起着重要作用^[28-29]。该序列在 MiEPT 中高度 保守(图3),从一级结构上确保了它的磷酸转移酶 功能。同时,基于氨基酸序列的聚类分析也指出, 来自缺刻缘绿藻和莱茵衣藻的 EPT 也显著地聚在 一支中(图 4)。这些结果预示着 MiEPT 也与莱茵 衣藻的 EPT 一样, 能将 CDP-乙醇胺上的磷酸乙 醇胺转移到 DAG 上,从而产生 PE。这个推断得 到了rMiEPT体外酶促反应产物TLC检测结果(图 7a)的证实,这样也鉴定了缺刻缘绿藻 EPT 的基因 功能。另外,本研究发现 MiEPT 也能作用于 CDP-胆碱以合成 PC, 即 MiEPT 具有双重酶活性, 但 EPT 的酶活性是其 CPT 酶活性的 10.3 倍(图 7b)。 酵母 EPT1 的 EPT 最大酶反应速度[Vmax=1.35 nmol/ (min·mg prot)] 大约是 CPT [V_{max}=0.62 nmol/ (min·mg prot)]的 2 倍^[28]; 而人的 EPT1 只能微弱 地利用 CDP-胆碱以合成 PC^[14]。由此看来, 缺刻 缘绿藻的 EPT 类似酵母和人的 EPT, 表现出较强 的 EPT 酶活性, 但从 CDP-胆碱上转移磷酸胆碱 的酶活性较弱。与此相反, 莱茵衣藻的 EPT 对 CDP-胆碱的亲和性(K_m=5 umol/L)却远高于 CDP-乙醇胺(Km=63 µmol/L)^[8]。有趣的是,尽管莱茵衣 藻的 EPT 表现出较高的 PC 合成能力, 但在细胞 中却检测不到 PC 的存在^[1,30]; 这可能是由于该藻 缺乏 CTP: 磷酸胆碱胞苷基转移酶, 以致藻细胞

中缺少合成 PC 的另一个底物——CDP-胆碱^[8]。

总之,本研究克隆并从功能上鉴定了编码缺 刻缘绿藻的 EPT 基因,这是非模式藻类 EPT 的首 例报道。从图 1 所示从头合成 PE 和 TAG 的代谢 途径来看,若 MiEPT 的基因表达被抑制,会使 DAG 向 TAG 的方向流动,从而引起 TAG 在藻细 胞中的累积。因此,本研究不仅有助于探讨缺刻 缘绿藻 TAG 的累积机理,也为利用基因工程等手 段对缺刻缘绿藻等藻类的 TAG 合成途径进行改 造提供了技术支撑。

参考文献:

- Li-Beisson Y, Beisson F, Riekhof W. Metabolism of acyllipids in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. The Plant Journal, 2015, 82(3): 504-522.
- [2] Jouhet J, Maréchal E, Block M A. Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells[J]. Progress in Lipid Research, 2007, 46(1): 37-55.
- [3] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances[J]. The Plant Journal, 2008, 54(4): 621-639.
- [4] Eichmann T O, Lass A. DAG tales: The multiple faces of diacylglycerol-stereochemistry, metabolism, and signaling
 [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(20): 3931-3952.
- [5] Li-Beisson Y, Thelen J J, Fedosejevs E, et al. The lipid biochemistry of eukaryotic algae[J]. Progress in Lipid Research, 2019, 74: 31-68.
- [6] McMaster C R, Bell R M. CDP-ethanolamine: 1, 2-diacylglycerol ethanolamine-phosphotransferase[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1997, 1348(1-2): 117-123.
- [7] Gibellini F, Smith T K. The Kennedy pathway—*De novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine[J]. IUBMB Life, 2010, 62(6): 414-428.
- [8] Yang W, Moroney J V, Moore T S. Membrane lipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Ethanolaminephosphotransferase is capable of synthesizing both phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 430(2): 198-209.
- [9] Tong M, Yu S Y, Ouyang L L, et al. Comparison of increased arachidonic acid content in *Myrmecia incisa* cultured during the course of nitrogen or phosphorus starvation[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(5): 763-773. [童牧, 于水燕, 欧阳珑玲, 等. 氮饥饿与磷饥饿促使缺刻缘绿藻 花生四烯酸含量增加的比较研究[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 763-773.]
- [10] Ouyang L L, Chen S H, Li Y, et al. Transcriptome analysis reveals unique C4-like photosynthesis and oil body formation in an arachidonic acid-rich microalga *Myrmecia incisa* Reisigl H4301[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 396.
- [11] Reisigl H. Zur systematik und ökologie alpiner Bodenal-

gen[J]. Österreichische Botanische Zeitschrift, 1964, 111(4): 402-499.

- [12] Stanier R Y, Kunisawa R, Mandel M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chlorococcales)[J]. Bacteriological Reviews, 1971, 35(2): 171-205.
- [13] Richards E, Reichardt M, Rogers S. Preparation of genomic DNA from plant tissue[J]. Current Protocols in Molecular Biology, 1994, 27(1): 2.3.1-2.3.7.
- [14] Horibata Y, Hirabayashi Y. Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase 1[J]. Journal of Lipid Research, 2007, 48(3): 503-508.
- [15] Chen J, Wang L L, Shi W W, et al. Cloning of *srp* gene from the gametophytes of *Laminaria japonica* and its expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1165-1173. [陈晶,王丽丽,石微微,等.海带配子 体中孢子形成相关蛋白(SRP)基因的克隆及其原核表达[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1165-1173.]
- [16] Bowie J U. Helix packing in membrane proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 272(5): 780-789.
- [17] Dewey R E, Wilson R F, Novitzky W P, et al. The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferasedeficient mutant of yeast[J]. The Plant Cell, 1994, 6(10): 1495-1507.
- [18] Goode J H, Dewey R E. Characterization of aminoalcoholphosphotransferases from *Arabidopsis thaliana* and soybean [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1999, 37(6): 445-457.
- [19] Choi Y H, Lee J K, Lee C-H, et al. cDNA cloning and expression of an aminoalcoholphosphotransferase isoform in Chinese cabbage[J]. Plant and Cell Physiology, 2000, 41(9): 1080-1084.
- [20] Sutoh K, Sanuki N, Sakaki T, et al. Specific induction of TaAAPT1, an ER- and Golgi-localized ECPT-type aminoalcoholphosphotransferase, results in preferential accumulation of the phosphatidylethanolamine membrane phospholipid during cold acclimation in wheat[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 72(4-5): 519-531.
- [21] Hjelmstad R H, Bell R M. sn-1, 2-diacylglycerol cholineand ethanolaminephosphotransferases in Saccharomyces cerevisiae. Nucleotide sequence of the EPT1 gene and comparison of the CPT1 and EPT1 gene products[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(8): 5094-5103.
- [22] Hjelmstad R H, Morash S C, McMaster C R, et al. Chimeric enzymes. Structure-function analysis of segments of sn-1, 2diacylglycerol choline- and ethanolaminephosphotransferases [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(33): 20995-21002.
- [23] McMaster C R, Bell R M. Phosphatidylcholine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Regulatory insights from studies employing null and chimeric *sn*-1, 2-diacylglycerol choline- and ethanolaminephosphotransferases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(45): 28010-28016.
- [24] Miroux B, Walker J E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels[J]. Journal of Molecular Biology, 1996, 260(3): 289-298.

- [25] Dilworth M V, Piel M S, Bettaney K E, et al. Microbial expression systems for membrane proteins[J]. Methods, 2018, 147: 3-39.
- [26] Kesidis A, Depping P, Lodé A, et al. Expression of eukaryotic membrane proteins in eukaryotic and prokaryotic hosts[J]. Methods, 2020, 180: 3-18.
- [27] Terpe K. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(5): 523-533.
- [28] Hjelmstad R H, Bell R M. sn-1, 2-diacylglycerol choline-

and ethanolaminephosphotransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. Mixed micellar analysis of the *CPT1* and *EPT1* gene products[J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(7): 4357-4365.

- [29] Sciara G, Clarke O B, Tomasek D, et al. Structural basis for catalysis in a CDP-alcohol phosphotransferase[J]. Nature Communications, 2014, 5: 4068.
- [30] Giroud C, Gerber A, Eichenberger W. Lipids of *Chlamydo-monas reinhardtii*. Analysis of molecular species and intracellular site(s) of biosynthesis[J]. Plant and Cell Physiology, 1988, 29(4): 587-595.

Characterization and identification of a CDP-ethanolamine: 1, 2-diacylglycerol ethanolamine phosphotransferase gene from the microalga (*Myrmecia incisa*)

JIAO Jianlu¹, FENG Bing¹, BI Yanhui¹, ZHOU Zhigang²

- 1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources Conferred by Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
- 2. International Research Center for Marine Biosciences Conferred by Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The gene *MiEPT*, which encodes cytidine diphosphate (CDP)-ethanolamine: diacylglycerol ethanolamine phosphotransferase (EPT), was cloned from the green microalga Myrmecia incisa Reisigl H4301 using reverse transcription PCR and 5'- and 3'-rapid-amplification of the cDNA end (RACE) techniques. Its full-length cDNA was 1914 bp and consisted of 217 bp 5'-untranslated region (UTR), 533 bp 3'-UTR, and a 1164 bp open reading frame (ORF), which encoded a 387-amino-acid protein. Its corresponding DNA was amplified with the genomic DNA extracted from M. incisa as a template and was 2853 bp. Comparing the corresponding cDNA and DNA sequences illustrated that the ORF of *MiEPT* was separated by six introns into seven exons. MiEPT, the product of *MiEPT*, was predicted to be an integral membrane protein with eight transmembrane regions. Multiple sequence alignment showed that MiEPT possessed a CDP-alcohol phosphatidyltransferase motif. A neighborjoining phylogeny was constructed on the basis of the deduced amino acids of EPTs from different species. It illustrated that MiEPT was clustered with a known EPT of Chlamydomonas reinhardtii, suggesting they had a similar function. To identify the function of MiEPT, a prokaryote expression vector pET-23a was successfully employed for the recombinant MiEPT in Escherichia coli. The recombinant MiEPT was isolated from the transgenic E. coli and partially purified by ultracentrifugation. The products of the enzymatic reaction in vitro were analyzed by thin-layer chromatography (TLC), demonstrating that MiEPT had activities of both EPT and choline phosphotransferase (CPT). A TLC-flame ionization detection analysis indicated that the EPT activity of MiEPT was 10.3 times higher than that of CPT. It is concluded that MiEPT could participate in the biosynthesis of phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine in *M. incisa*, but it preferentially uses CDP-ethanolamine as a phosphate donor to produce PE.

Key words: *Myrmecia incisa*; ethanolamine phosphotransferase (EPT); choline phosphotransferase (CPT); phosphatidylethanolamine (PE); phosphatidylcholine (PC); membrane protein

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn